

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA**

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie
Oddělení fyziologie a biochemie buňky

Bakalářská práce

Úloha signalizace přes mTOR pro invazivitu nádorových buněk

Kristýna Bicanová

Školitel: RNDr. Jan Brábek, PhD

Praha 2007

Poděkování patří mému školiteli **RNDr. J. Brábkovi, PhD** a **RNDr. D.Röselovi, PhD** za trpělivý přístup a věcné připomínky k této práci.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: **Úloha signalizace přes mTOR pro invazivitu nádorových buněk** vypracovala samostatně s pomocí citované literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Srpen 2007

Kristýna Bicanová

Abstrakt

Práce se zaměřuje na roli proteinu mTORu v invazivitě nádorových buněk. mTOR (mammalian target of rapamycin) je evolučně konzervovaná proteinová kináza, regulující mnoho aspektů života buňky, mimo jiné buněčný růst a proliferaci. V eukaryotické buňce se mTOR vyskytuje ve dvou strukturně i funkčně odlišných multiproteinových komplexech. mTOR komplex 1 reguluje produkci proteinů na úrovni transkripce a translace a mTOR komplex 2 má vliv na proteiny spojené s aktinovým cytoskeletem. Předpokládaná role komplexu 1 v invazivitě je regulace exprese extracelulárních proteolytických enzymů, proteinů angiogenetické kaskády a Rho/ROCK signální dráhy. Další diskutovaná možnost je vliv na aktinový cytoskelet aktivací Rho-proteinů a snížení fosforylace PKC komplexem 2.

klíčová slova: mTOR, PI3K, Akt, invazivita

Abstract

This study focuses on the role of protein mTOR in the invasiveness of transformed cells. mTOR (mammalian target of rapamycin) is evolutionary highly conserved protein kinase regulating a plenty of aspects of cell life, e.g. cell growth and proliferation. In the eucaryotic cell mTOR is found in two structurally and functionally distinct multiprotein complexes. mTOR complex 1 regulates production of proteins at transcriptionary and translational levels and mTOR complex 2 influences the cell shape through proteins associated with actin cytoskeleton. The proposed role of mTOR in the invasiveness is regulation of the expression of extracellular proteolytic enzymes, angiogenetic proteins and proteins of Rho/ROCK signalling pathway through complex 1. Another discussed possibility is the regulation of actin cytoskeleton through activation of Rho-proteins and modulating PKC by mTOR-complex 2. This features and their possible contribution to tumour cell invasiveness will be discussed.

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------------|---|
| mTOR | mammalian target of rapamycin, Ser/Thr kináza |
| PI3K | phosphatidylinositol 3-kináza |
| MMP | metaloproteináza |
| GAP | protein aktivující GTP-ázu |
| S6K | kináza ribozomálního S6 proteinu |

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 7 |
| 1. INVAZIVITA | 8 |
| 1.1. Améboidní invazivita | 9 |
| 1.2. Mesenchymální invazivita | 10 |
| 1.3. Specifické struktury | 13 |
| 2. mTOR | 14 |
| 2.1. Struktura | 14 |
| 2.2. Inhibitory | 16 |
| 2.3. PI3K/ Akt/ mTORC1 dráha | 17 |
| 2.4. mTORC2 signalizace | 21 |
| 3. ROLE mTOR V INVAZIVITĚ | 22 |
| 3.1. Exprese proteolytických enzymů | 23 |
| 3.2. Angiogeneze | 26 |
| 3.3. Aktinový cytoskelet | 29 |
| 4. ZÁVĚR | 31 |
| SEZNAM LITERATURY | 32 |

ÚVOD

Cílem této práce je ozřejmit úlohu proteinu mTOR v invazivitě nádorových buněk. mTOR (mammalian target of rapamycin) je klíčovým regulátorem mnoha signálních drah ovlivňujících přežití a růst buňky. Mezi jeho funkce patří kontrola růstu a proliferace, biosyntézy a iniciační a elongační fáze translace, ale má vliv i na aktinový cytoskelet.

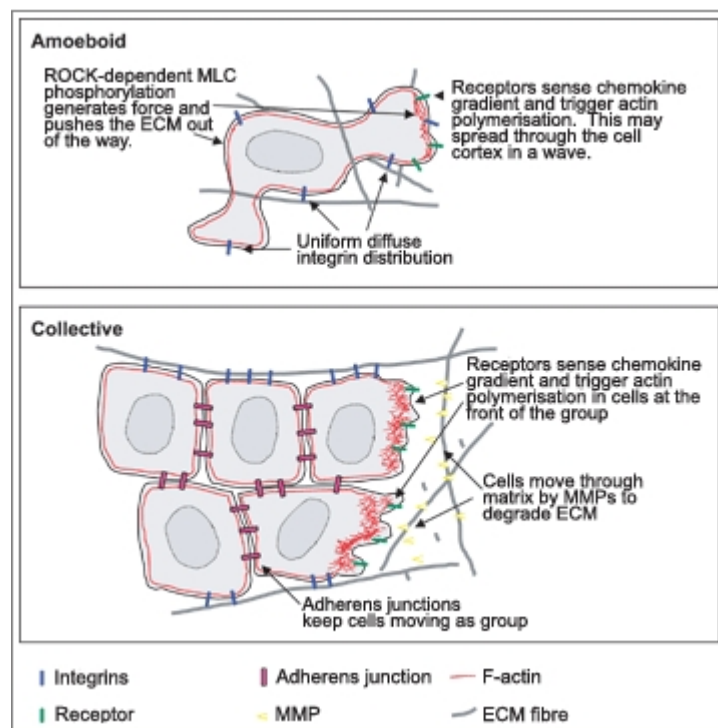
Pro onkogenní transformaci je významná PI3 kinázová dráha, jejíž součástí je i mTOR. Aktivovaná PI3K umožňuje aktivační fosforylaci kinázy Akt a přes řadu dalších efektorů aktivaci mTORu. Aktivovaný mTOR komplex1 přes své substráty reguluje iniciační a elongační fázi translace. mTOR komplex 2 působí jako Ser-kináza vůči Akt a fosforylací Akt aktivuje.

Cílem práce je nastínění možných mechanismů vlivu mTORu na invazivní fenotyp nádorových buněk.

1. INVAZIVITA

Nejobávanějším aspektem onkogenních onemocnění je schopnost metastazovat, tzn. schopnost buněk primárního tumoru vymanit se z původní tkáně, migrovat do okolních tkání a krevním řečištěm či lymfatickým systémem a zakládat kolonie na vzdálených místech. Klíčový děj, který charakterizuje maligní (metastatický) tumor, je invazivita- tedy disrupce adhezivních mechanismů a překonání bariéry extracelulární matrix.

V závislosti na způsobu, jakým nádorová buňka může překonat bariéru extracelulární matrix, lze rozlišit dva základní typy invazivity. Liší se od sebe jak fenotypem buněk, tak i zapojením rozdílných signálních drah a produkcí a aktivací odlišných proteinů.



Obr. 1: Model améboidní a mesenchymální invazivity (převzato ze stránky laboratoře Tumor Cell Biology, Cancer Research, UK, www.cancerresearchuk.org)

Pro mesenchymální typ invazivity je typická deregulace signalizace přes integriny a degradace proteinů extracelulární matrix proteolytickými enzymy metaloproteinázami. Naopak améboidní typ invazivity pericelulární proteolýzu nevyžaduje, jejím hlavním rysem je zapojení signalizace Rho/ROCK a fosforylace lehkého řetězce myosinu (MLC), vedoucí patrně k vytvoření dostatečné mechanické síly k překonání ECM.

1.1. Améboidní typ invazivity a specifické proteiny

Sahai a Marshall, 2003, definovali dva způsoby invazivity nádorových buněk: mesenchymální a améboidní. Motilita nádorových buněk v 3D se u těchto dvou typů invazivity liší jak fenotypem buněk, tak i zapojením různých signálních drah a využitím jiných proteinů.

Améboidní typ invazivity je podporován Rho signalizací přes ROCK a nevyžaduje pericelulární proteolýzu. Podmínkou je zřejmě i ezrin, lokalizovaný ve směru pohybu (Sahai and Marshall, 2003). Ezrin patří společně s moesinem a radixinem do skupiny proteinů, jejichž funkcí je připojení plasmatické membrány k aktinovému cytoskeletu. Ezrin má také důležitou funkci v interakci mezi buňkami i mezi matrix a buňkou, jeho inhibice vyvolává zvýšenou motilitu a invazivitu (Hiscox and Jiang, 1999).

Do Rho rodiny malých GTPáz patří dobře prostudované RhoA, Cdc42 a Rac1., známé regulátory aktinového cytoskeletu a adhezivních struktur. Cdc42 a Rac 1 jsou primárně zodpovědné za formaci protrusivních struktur, RhoA generuje kontraktilitu závislou na myosinu. (shrnuté v Arthur *et al.*, 2002). Důležitým efektozem Rho-GTPáz jsou Rho-dependentní Ser/Thr kinázy, které se podílí na fosforylaci dalších efektorů. Rho/ROCK závislá fosforylace MLC lokalizovaného u aktin bohatého výběžku invadující buňky je schopna generovat dostatečnou mechanickou sílu pro překonání ECM. (Wyckoff *et al.*, 2006)

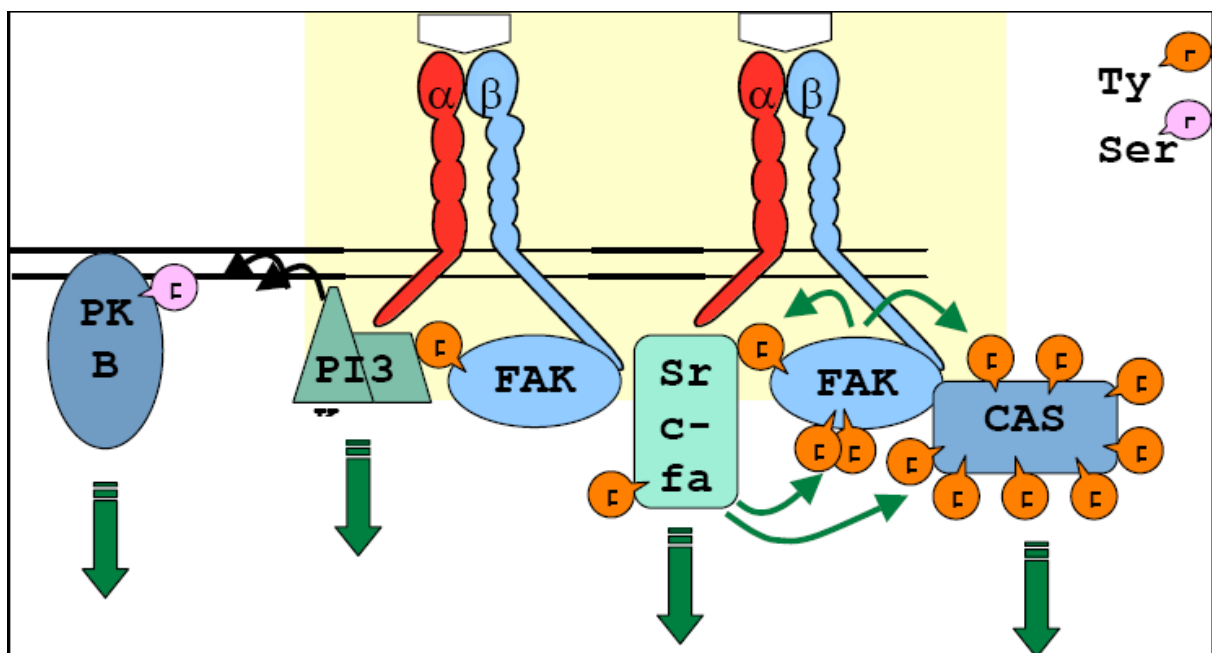
Carragher *et al.*, 2006 navíc demonstrovali na HT1080 fibromasarkomových buňkách nezávislost améboidního typu invazivity na intracelulární proteolytické aktivitě calpainu 2, $\alpha 2\beta 1$ integrinu a autofosforylaci FAK. Naopak, Rho/ROCK inhibitor Y27632 tyto rysy mesenchymální invazivity obnovuje. (Carragher *et al.*, 2006)

Pokud je pericelulární proteolýza zablokována, některé nádorové buňky jsou schopny změnit mesenchymální model invazivity na améboidní, který jim dovoluje invadovat bez degradace okolní matrix. (Sahai and Marshall, 2003; Carragher *et al.*, 2006)

1.3.Mesenchymální invazivita

Hlavním rysem mesenchymální invazivity je deregulace integrinové signalizace, jejíž součástí jsou i další signální proteiny jako proteinové i lipidové kinázy a důležité adaptorové proteiny. Signalizace skrze integriny může vést až ke změnám aktinového cytoskeletu a produkci extracelulárních proteolytických enzymů metaloproteináz.

Integriny jsou heterodimerní povrchové receptory skládající se ze dvou transmembránových podjednotek, α a β , jejichž kombinace tvoří receptory schopné vázat různé proteinové komponenty extracelulární matrix k aktinovému cytoskeletu. Navíc tato vazba aktivuje intracelulární signální kaskádu, jíž se účastní řada protein tyrosin kináz a adaptorových proteinů. (shrnuto v Christofori,2006)

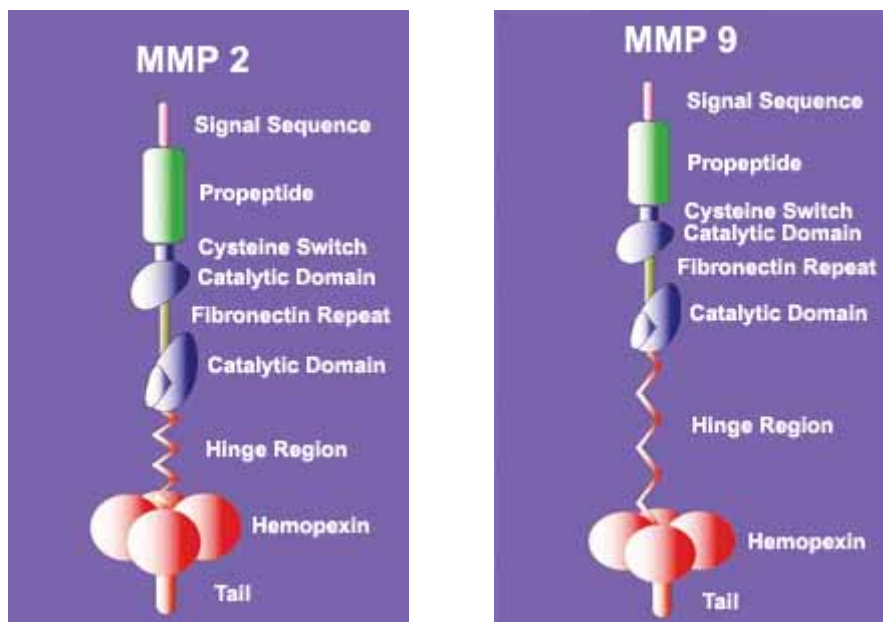


Obr.2 : Integrinová signalizace a hlavní proteiny s ní spojené (převzato ze stránek Uppsala Universitet, www.uu.se)

Po stimulaci integrinových receptorů dochází k jejich shlukování a tvorbě specifických míst-fokálních adhezí, kde je buňka přichycena k substrátu. Po dimerizaci receptoru vazbou ligandu se intracelulární část sdružuje s kotvícími proteiny- talinem, paxillinem a vinculinem. Na tyto proteiny se pak svou C- koncovou částí váže nerekceptorová proteinová kináza FAK.

Její seskupování v místě fokálních adhezí vede k autofosforylaci na Tyr397 a umožnění vazby dalších efektorů, obsahujících SH2- domény- mezi ně patří další kinázy Src, PTEN či PI(3)K. Dále je FAK schopna svou polyprolinovou doménou vázat adaptorový protein Cas nebo PLC- γ . Jedním z možných následných dějů je indukce MAPK/ERK/JNK signální dráhy a exprese MMP.

Matrixové metaloproteázy (MMP) jsou rodina zinek-dependentních endopeptidáz, podle substrátové specifity a doménové struktury se dělí do čtyř velkých podskupin. Primární mechanismus, kterým MMP přispívají k invazivitě, je degradace proteinů extracelulární matrix jako např. kolagen IV, laminin, proteoglykany apod.



Obr.3 : Struktura MMP-2 (gelatinasa A) a MMP-9 (gelatinasa B) (převzato z www.sigmaaldrich.com)

Pro invazivitu mesenchymálních buněk je klíčová degradace kolagenu IV gelatinázou A (MMP-2) a gelatinázou B(MMP-9), které jsou sekretovány v neaktivní, zymogenní formě (shrnuto v Duffy *et al.*,2000). Příkladem může být aktivace gelatinázy A MT1-MMP. MT1-MMP- aktivní místo a N-koncová doména TIMP-2 mohou asociovat za vzniku receptoru pro pro-gelatinázu A. Tato vazba dovoluje volné MT1-MMP aktivovat zymogenní formu gelatinázy A. V nízkých koncentracích TIMP-2 umožňuje aktivaci, ve vysokých koncentracích ji naopak inhibuje (Will *et al.*,1996).

Nezbytná je také lokalizace těchto proteáz do podosomu či invadopodií. Nakahara *et al.*,(1996) v experimentu s lidskými melanomovými buňkami doložili, že zvýšená exprese membránově vázané MT1-MMP aktivuje solubilní MMP-2 (gelatinasa A), avšak po prevenci lokalizace do invadopodií konkavalinem A nedocházelo k degradaci ECM či invazi (Nakahara *et al.*,1996).

U MMP byly popsány i jiné funkce než pouze degradace ECM. Mohou uvolňovat aktivní růstové a angiogenní faktory, štěpit receptory růstových faktorů aj.

1.3. Specifické struktury

Zmíněné proteiny související s invazivitou se často shlukují do specifických adhezivních struktur. Zde jsou probírány příbuzné povrchové struktury podosomy a invadopodia. V literatuře jsou obě struktury rozlišeny jen vágně, autoři se v jejich charakterizaci přesně neshodují.

Podosomy jsou vysoce dynamické adhezivní struktury pozorované hlavně u makrofágů, osteoklastů, buněk hladkého svalstva, ale také u buněk transformovaných.

Základní charakteristiky jsou:

- (1) formace v místě kontaktu buňky se substrátem
- (2) střed struktury bohatý na F-aktin, obklopený prstencem obsahujícím proteiny jako vinculin a talin
- (3) průměr 0,5 μm , dynamické sestavování nevyžadující *de novo* syntézu proteinů .

Podle těchto kritérií mohou být podosomy odlišeny od podobných struktur, jako fokální adheze nebo invadopodia (odlišná organizace) (shrnuto v Linder and Aepfelbacher, 2003).

VSMC (vascular smooth muscle cells) po opůsobení forbol esterem resorbují komponenty extracelulární matrix v místě podosomu a jeho tvorba pozitivně koreluje se zvýšením motility i polarizace na fibronektinovém substrátu. Změna fenotypu je doprovázena změnou aktinového cytoskeletu a zvýšenou produkcí a sekrecí MMP (Burgstaller and Gimona, 2004).

Invadopodia jsou další velmi příbuzné povrchové struktury typické pro invazivní buňky, jejich hlavními rysy je dynamická motilita společně s adhezí a degradací extracelulární matrix. Mezi důležité biochemické vlastnosti patří lokalizace onkogenní varianty Src, vysoký stupeň asociace talin- β 1 integrinu s extracelulární matrix, zvýšená tyrosinová fosforylace skupiny proteinů a lokalizace metaloproteináz jako MMP-2, sepráza a MT1-MMP (Nakahara *et al.*, 1997)

2. PROTEIN mTOR

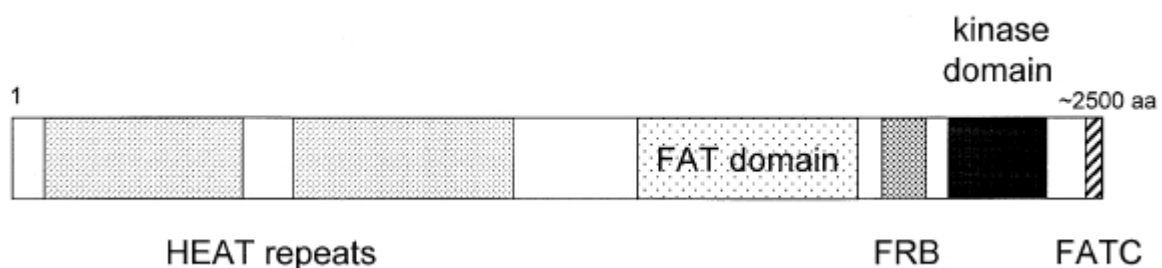
mTOR (mammalian target of rapamycin; často také RAFT, FRAP či RAPT1) je klíčový regulátor buněčného růstu a proliferace jako odpovědi na energetický stav, živiny, růstové faktory a osmotický stres. Mezi buněčné děje, které mTOR signální dráha ovlivňuje, patří mimo jiné import aminokyselin, autofágie, iniciační a elongační fázi translace, transkripce mnoha enzymů a také biosyntéza ribozómů.

2.1.Struktura

mTOR je 289 kDa Ser / Thr kináza , jeho C-koncový region sdílí vysokou homologii s katalytickou doménou phosphatidylinositol 3- kinázy (PI3K). Díky této homologii je řazen do rodiny PI3K příbuzných kináz. Enzymy z této kinázové rodiny přes svou homologii s lipidovými kinázami nevykazují žádnou lipidovou kinázovou aktivitu a všechny jsou výlučně proteinové kinázy.(Schmelzle *et al.*,2000,Fry *et al.*,2001)

Ke katalytické doméně je připojena FRB (FKBP- rapamycin binding) doména, důležitá pro inhibici funkce mTORu. Na ní navazuje FAT doména, jejíž funkce není zcela objasněna.

Blíže N- konci se vyskytuje 20 tandemově se opakujících HEAT motivů, zprostředkujících protein- protein interakce.Na úplném C- konci protein obsahuje krátkou FATC doménu. Tato doména se objevuje pouze v kombinaci s FAT doménou a může být nezbytná pro katalytickou funkci.



Obr.4 : Struktura mTORu (převzato z Schmelzle *et al.*,2000)

V buňce se mTOR vyskytuje ve dvou strukturně i funkčně odlišných multiproteinových komplexech. Lépe popsáným je rapamycin-senzitivní komplex mTORC1, skládající se z proteinů mLST8/GβL (G-protein β-subunit-like protein) a raptor. Rapamycin nesenzitivní komplex mTORC2 je tvořen také mTOR a GβL, ale místo raptoru obsahuje protein rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR). Raptor, rictor a GβL obsahují, stejně jako mTOR, repetitivní sekvence HEAT a WD40, účastníci se protein-proteinových interakcí (shrnutí v Sarbassov *et al.*, 2005; Reiling and Sabatini, 2006). mTORC2 je tradičně pokládán za rapamycin-nesenzitivní, avšak teprve v nedávné studii Sarbassov *et al.* dokázali, že delší (více než 24 h) působení rapamycinu může narušit skládání a funkci rictorového komplexu blokací nově syntetizovaných molekul mTORu (Sarbassov *et al.*, 2006). Intracelulárně jsou oba komplexy v dynamické rovnováze, pokles rictor-mTOR koreluje se vzestupem raptor-mTOR komplexu.(Sarbassov *et al.*,2004)

2.2. Inhibitory

Pro výzkum i klinické využití jsou podstatné některé inhibitory kinázové aktivity mTORu. Patří mezi ně rapamycin, který je vysoce specifický pro mTOR, a wortmannin s LY294002, inhibující aktivitu PI3- příbuzných kináz. V široké řadě experimentálních tumorů, mj. lymphomů nebo rhabdomyosarkomů, mají tyto inhibitory antiproliferativní účinek.

Imunosupresant rapamycin je lipofilní makrolid, původně izolovaný z bakterie *Streptomyces hygroscopicus*, vyskytující se na Velikonočních ostrovech. Jeho farmakologický účinek je závislý na vazbě intracelulární receptor FKBP12 (FK506-binding protein, mol. velikost 12 kDa). Tento komplex se specificky váže na FRB doménu mTORu a tím inhibuje jeho kinázovou aktivitu (Brunn *et al.*; 1996; Carraway *et al.*; 2004; Raught *et al.*; 2001;). Jeho nízká rozpustnost ve vodě a chemická stabilita limituje jeho klinické využití při léčbě rakoviny. Zároveň byly vyvinuty rapamycinové analogy s lepšími farmaceutickými charakteristikami, např. CCL-779, RAD 001 nebo AP23573. (Carraway *et al.*; 2004).

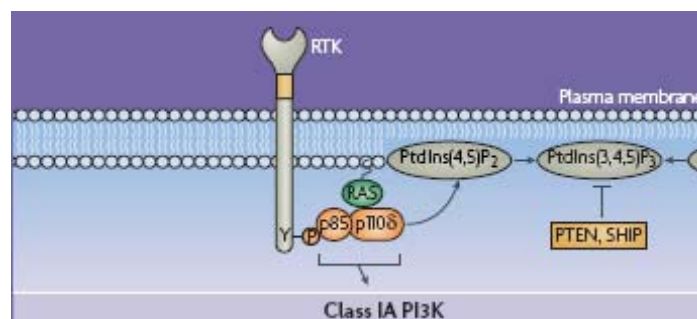
Další inhibitory působící na kinázovou aktivitu mTOR jsou strukturně nepřibuzné PI(3)K-inhibitory wortmannin a LY294002. Wortmannin vykazuje inhibiční účinek na serin-specifickou autokinázovou aktivitu v submikromolárních koncentracích a pouze v nepřítomnosti DTT.

LY294002 efektivně působí na katalytickou doménu mTORu v koncentracích, které jsou obdobné pro inhibici savčích PI(3)-kináz. (Brunn *et al.*, 1996)

2.3. PI3K/ Akt/ mTORC1 signalizace

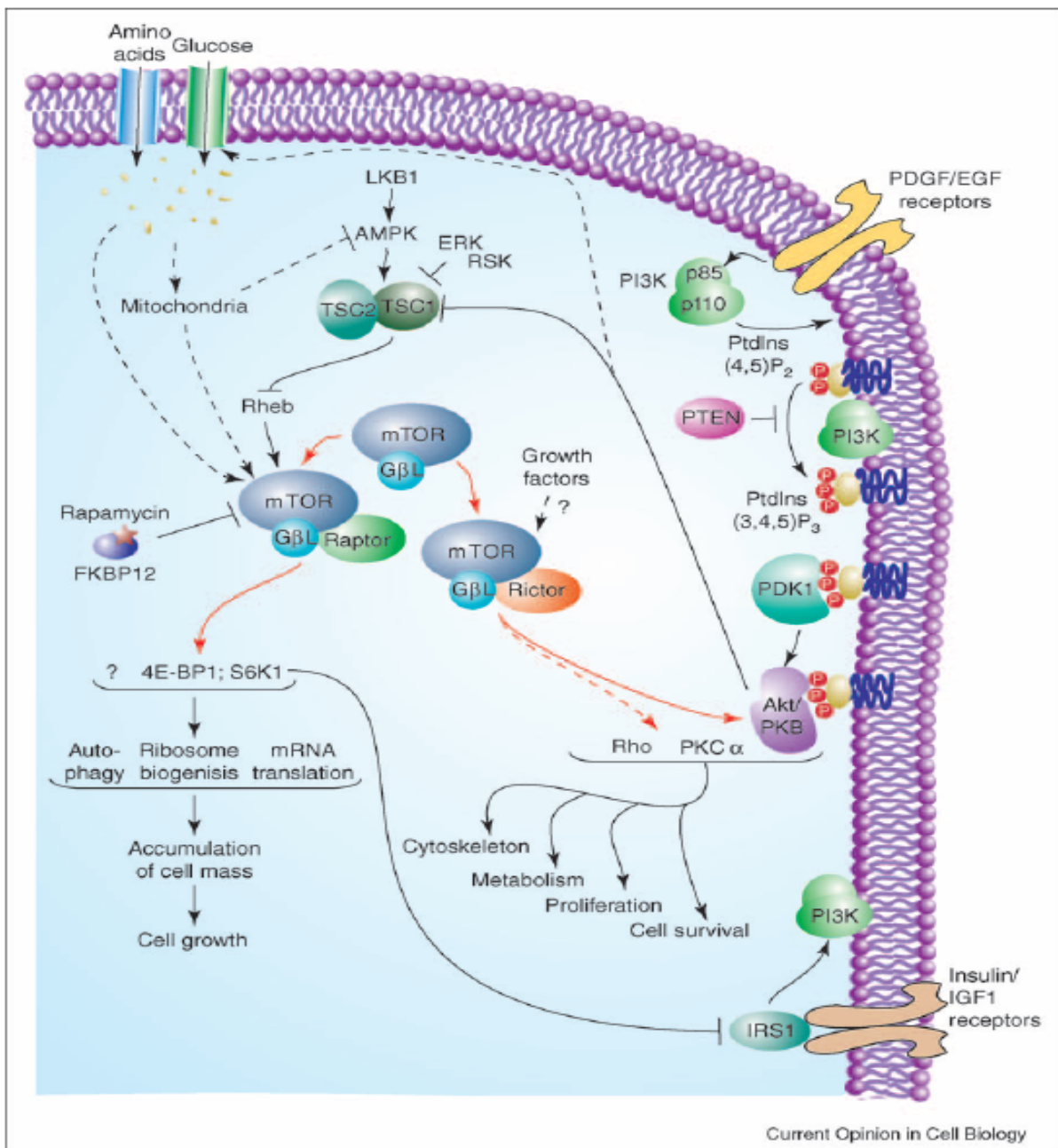
Pro onkogenní transformaci buněk je klíčová dráha fosfatidylinositol 3-kinázy, poskytující buňce signály pro přežití. Této dráhy se dále účastní kináza Akt, která přes komplex tumor supresorových proteinů TSC1/TSC2 ovlivňuje aktivitu mTOR komplexu 1. Známými substráty mTORC1 jsou S6 kináza a 4E- vazebný protein, účastníci se translace.

Phosfatidylinositol 3-kináza byla poprvé identifikována v 80. letech jako lipidová kináza asociovaná s některými onkogenními produkty, mj. v-Src. PI3K třídy I je často sdružována s receptory růstových faktorů a také s PTK (protein tyrosin kinázy) či RTK, IRS, na jejichž aktivované formy se váže dvěma SH2 doménami p85 podjednotky (shrnutí v Fry, 2001; Shaw et al., 2006). Jako příklad efektorového receptoru této kinázy lze uvést erbB-2 (typ I RTK). Jeho nadprodukce v lidských buňkách prsního epitelu se projevuje transformovaným fenotypem, zahrnujícím nezávislost na růstových faktorech, růst nezávislý na ukotvení, motilitu a invazivitu. Tyto změny vyvolává nepřetržitá aktivace katalytické podjednotky PI(3)-kinázy a aktivace jejích efektorů (Ignatowski *et al.*, 2003). Jiným příkladem efektoru může být v-Crk, jenž může napodobovat integrinové signály i v případě nepřítomnosti buněčné adheze k extracelulární matrix (Akagi *et al.*, 2002). p110 katalytická podjednotka je schopna fosforylovat D3 pozici inositolového kruhu membránového lipidu PI-4,5-P₂ a vytvářet PtdIns(3,4,5)P₃, membránově vázaný druhý posel působící na další signální proteiny jejich membránovou lokalizací přes PH doménu (shrnutí v Shaw and Cantley, 2006).



Obr.5 : Aktivace PI3K a tvorba PtdIns(3,4,5)P₃ (převzato z Vanhaesebroeck *et al.*, 2006)

Nejnámějším a nejlépe charakterizovaným proteinem obsahujícím PH doménu je Ser/ Thr kináza AKT (PKB), často amplifikována v řadě lidských rakovinných onemocněních. Kináza navázána na PtdIns(3,4,5,)P3 je aktivována PDK1 a PDK2 fosforylací tyrosinu 308 a serinu 473. Dominantně negativní mutant interferuje s transformací virovou PI(3)-kinázou, což ukazuje na fakt, že onkogenní signály jdoucí přes PI(3)K jsou vedeny přes AKT a membránově lokalizovaná AKT se zvýšenou kinázovou aktivitou je nezbytná pro PI(3)K onkogenezi.(Aoki *et al.*,1998). Aktivovaná AKT fosforyluje tuberin (TSC2 produkt), čímž ho inhibuje (Manning *et al.*,2002).



Obr.5 : PI3K/ Akt / mTOR signalizace (převzato z Reiling and Sabatini, 2006)

Mutace TSC1 (hamartin) či TSC2 (tuberin) tumor supresorových proteinů způsobuje dědičné onemocnění tuberous sclerosis komplex (v závislosti na kontextu se TSC užívá jako označení choroby či genu), vyznačující se tvorbou benigních, vysoce vaskularizovaných nádorů. Tuberin/ hamartin heterodimer vykazuje GAP aktivitu vůči Rhebu (Tee *et al.*,2002), pro jeho inaktivaci je nezbytná C- koncová katalytická GAP doména.

Rheb (Ras homolog enriched in brain) je malý G- protein příbuzný s Ras podrodinou. Farnesylovaný GTP-Rheb působí aktivačně na mTOR signalizaci, zvyšuje fosforylaci S6K a 4EBP-1 způsobem nezávislým na PI(3)K, tzn. je přímým efektozem mTORu. Není známý přesný mechanismus této regulace, je možné, že se Rheb neváže přímo na mTOR, ale na některý z proteinů s ním interagujících (shrnuto v Inoki *et al.*,2005).

mTOR ovlivňuje buněčný růst, resp.proteosyntézu, převážně přes dva vzájemně nezávislé substráty : S6K a 4E-BP1 (v literatuře uváděn také jako PHAS-1).

Ribozomální S6K se vyskytuje v eukaryotické buňce ve dvou variantách: S6K1 a S6K2.

Reguluje translaci skupiny mRNA s 5' koncovými oligopyrimidiny (5' TOP)-tj. mRNA kódující většinou ribozomální proteiny a také mRNA kódující další komponenty translačního aparátu (shrnuto v Raught *et al.*,2001).

Hannah *et al.* ukázali, že ke stimulaci ribozomální DNA je třeba fosforylované S6K1 a tato stimulace je zprostředkována fosforylací C- koncové aktivační domény transkripčního faktoru UBF (Hannah *et al.*,2003).

Hypofosforylovaný 4E-BP1 působí jako represor iniciace translace vazbou na eukaryotický iniciační faktor 4E. Fosforylace mTOREM způsobuje jeho uvolnění a umožňuje eIF4e závislou iniciaci translace (shrnuto v Inoki *et al.*,2005).

Specifický motiv TOS, nalezený jak u S6K a 4E-BP1, zprostředkovává jejich přímou vazbu k raptoru, který je součástí mTOR komplexu 1.

mTORC1-dependentní translace kontroluje expresi mnoha klíčových regulátorů buněčného růstu- např. HIF-1 α .

V souvislosti s raptor-mTOR signalizací je na místě ještě zmínit fosfolipázu D, která stejně jako PI(3)K poskytuje transformovaným buňkám signály k přežití a zároveň je spojena s buněčnými procesy vedoucími k buněčné migraci. Zheng *et al.* na MDA-MB-231 lidských rakovinných buňkách navrhli model, kde schopnost metastazovat je součástí programu pro přežití, který potlačuje apoptózu a zvyšuje migraci stresovaných buněk do příznivějších podmínek. Potlačení apoptózy vyvolané PLD a zvýšená migrace a invazivita se realizuje skrze mTOR (Zheng *et al.*,2006).

2.4.mTORC2 signalizace

Popis PI3K-dráhy se zabývá raptor-mTOR komplexem. Druhý, teprve nedávno objevený komplex není zcela jasně funkčně charakterizován, pravděpodobně aktivačně fosforyluje Akt a také reguluje aktinový cytoskelet.

Rictor-mTOR komplex hraje esenciální roli v aktivaci Akt fosforylací jejího hydrofóbního motivu, konkrétně serinu 473 (Hresko *et al.*,2005;Sarbasov *et al.*,2004). mTOR-kinázové inhibitory LY294002 a wortmannin blokuji tuto fosforylaci, jak demonstrovali Sarbasov *et al.*(Sarbasov *et al.*,2004). Stejná studie dokazuje mTORC2-závislé snížení fosforylace protein kinázy C α (PKC α) a regulaci aktinového cytoskeletu. Naproti tomu tento komplex nemá vliv na velikost buněk či fosforylaci S6K (Sarbasov *et al.*,2004).

3. Role mTOR v invazivitě

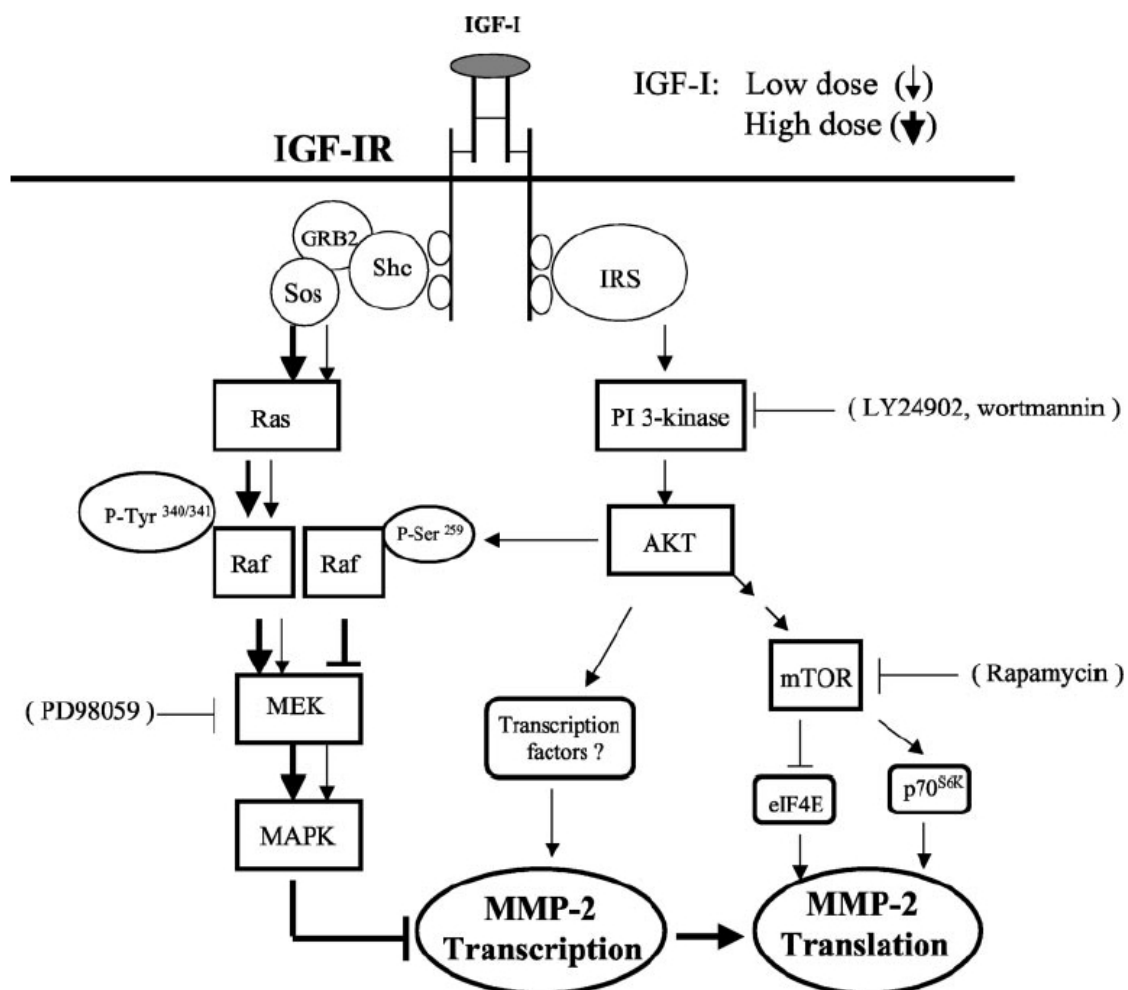
Otázkou zůstává, jakým způsobem signalizace přes mTOR přispívá k invazivnímu fenotypu buněk. Mnohé indicie naznačují, že mTOR rapamycin sensitive komplex jako součást PI3K/ Akt dráhy reguluje na translační úrovni produkci proteolytických enzymů a proteinů angiogenetické kaskády. Mimoto také kontroluje expresi Rho-proteinů, souvisejících s aktinovým cytoskeletem. Dalším předpokladem invazivity může být také kontrola buněčného tvaru a motility rapamycin nesensitivním mTOR komplexem. Tento komplex pravděpodobně reguluje polymeraci aktinu skrze Rho-GTPázy a PKC α . Pochopení těchto souvislostí a funkce mTORu a jeho efektoru je nezbytné pro možné klinické využití cílené terapie.

3.1.Regulace exprese proteolytických enzymů

Jedním z důležitých rysů invazivity mesenchymálních buněk je zvýšená produkce extracelulárních proteolytických enzymů, metaloproteináz, které narušují okolní ECM a umožňují buňkám uvolnit se z původní tkáně a migrovat do okolního prostředí. Pokusy s rapamycinem indikují vliv mTOR na produkci těchto enzymů.

Rapamycin je specifický inhibitor mTOR komplexu 1 a po delší době působení pravděpodobně zabraňuje i skládání komplexu 2. Jeho použitím lze tedy dokázat vliv mTORu . Heimberger et al. (2005) testovali působení rapamycinu na gliomové buněčné linie. Po 24 h působení rapamycinu byla u všech linií zjištěna prokazatelně nižší produkce VEGF. Po 48 h došlo ke snížení exprese MT1-MMP a dalších proteáz-MMP-2 a MMP-9 (Heimberger *et al.*,2005).

Syntéza a funkce MMP-2 je regulována na mnoha úrovních- aktivace transkripce, posttranskripční úpravy a také regulace proteolytické aktivity membránovými MMP a endogenními TIMP. MMP-2 je sekretována jako 72-kDa zymogen a je aktivována proteolytickým štěpením MT1-MMP. Možným regulátorem syntézy a aktivity této proteázy je typ 1 insulin-like growth factor receptor. Výsledek aktivace je závislý na různých faktorech, jako např.dostupnost ligandu a zesílení signálu může probíhat přes dvě hlavní signální dráhy: PI(3)K/ Akt / mTOR aktivuje MMP-2 promotor a zvyšuje proteinovou syntézu, naopak Raf/ MEK/ ERK ji snižuje (Zhang *et al.*,2004). Mimoto IGF-IR kontroluje invazi nádorových buněk regulací exprese MT1-MMP. MT1-MMP aktivace a invaze byla inhibována LY294002, wortmanninem a rapamycinem, což ukazuje na kritickou roli PI(3)K/ Akt/ mTOR dráhy v této regulaci (Zhang and Brodt,2003).



Obr.5 : Schéma kontroly translace a transkripce MMP-2 (převzato z Zhang and Brodt, 2003)

Další práce na téma produkce metaloproteináz se zabývají hlavně rolí Akt. Akt je efektor mTOR-komplexu 1 a svou činností tento komplex aktivuje.

Park *et al.*, 2001 se zaměřili na roli Akt1 v buněčné motilitě a invazivitě. Akt1 u myších epiteliálních buněk zvyšovala expresi MMP-2, pravděpodobně kontrolou na úrovni transkripce. Studie se nezabývá rolí mTORu v této indukci invazivity, vzhledem ke zmiňované aktivaci mTORu touto kinázou ji lze předpokládat (Park *et al.*, 2001)

Obdobná studie Suzuki *et al.*, 2004 se zabývá vlivem Akt na ARK5, patřící do rodiny AMPK, a jeho možným významem v metastatické aktivitě nádorových buněk.

U buněk nadprodukcujících ARK5 byl ve srovnání s kontrolou zjištěn vyšší obsah aktivních forem MMP-2 a MMP-9 v médiu. Množství MMP-9 bylo navíc zvýšeno vystavením těchto buněk IGF-1. Aktivace obou metaloproteináz tímto růstovým faktorem byla inhibována

LY294002, což ukazuje na roli PI(3)K/ Akt. Tyto buňky také exprimovaly vyšší množství MT1-MMP, zvýšená produkce byla potlačena rapamycinem. ARK5 pravděpodobně reguluje expresi na translační úrovni fosforylací mTORu. (Suzuki *et al.*,2004)

Z těchto poznatků lze vyvodit, že mTOR prokazatelně ovlivňuje produkci MMP, a to nejspíše na úrovni translace.

3.2 Angiogeneze

Důležitým předpokladem jak pro přežití tak i růst buněk je dostupnost živin, růstových faktorů a kyslíku. mTOR má nejspíše zásadní úlohu ve stresových odpovědích na nedostatek těchto faktorů. Jedním z možných způsobů, jak zajistit dostatečné zásobení buněk, je produkce proteinů účastnících se angiogeneze, tj. tvorby nových kapilár. Mezi proteiny angiogenetické kaskády patří např. HIF a VEGF.

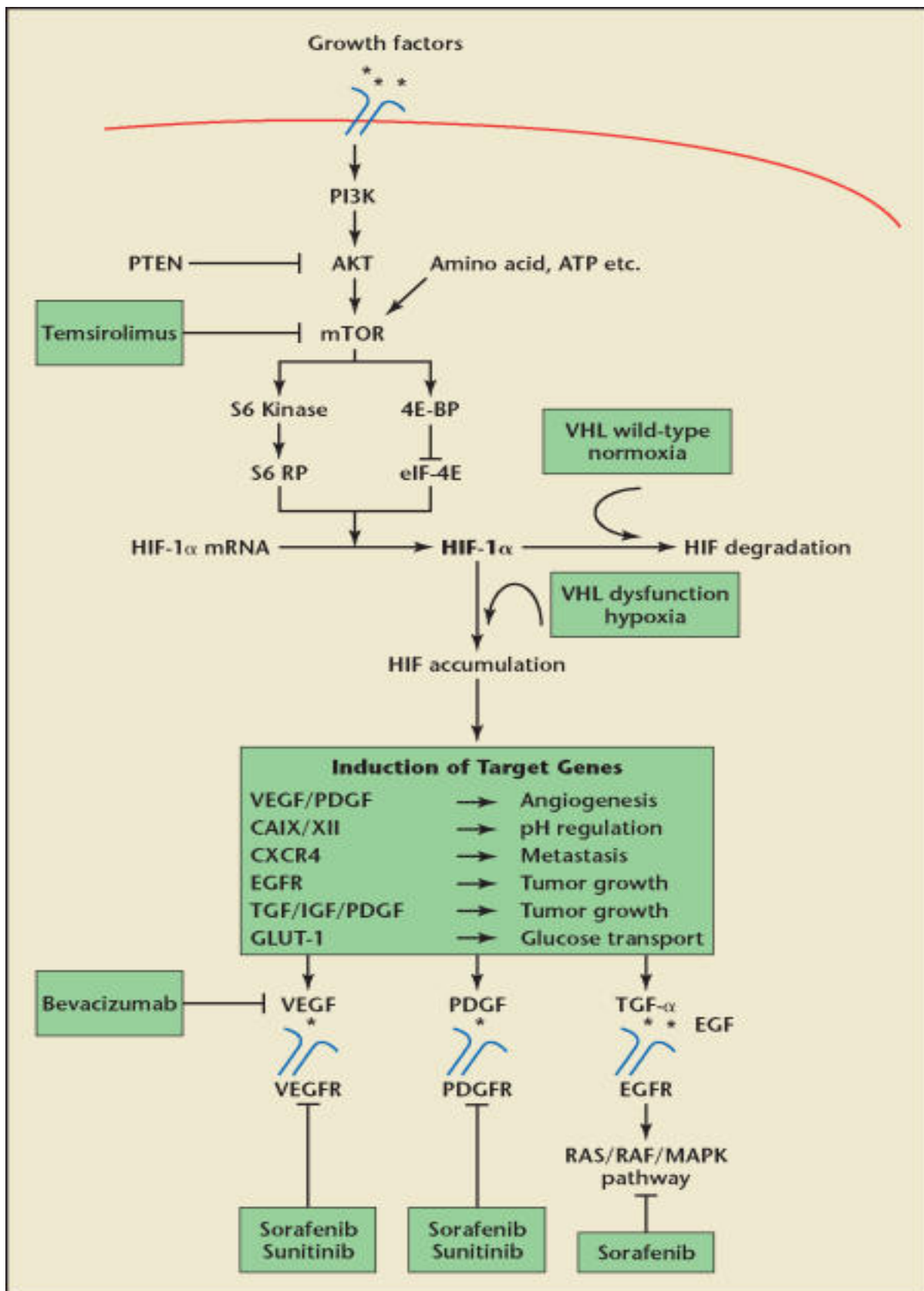
Nedostatek kyslíku způsobuje zvýšenou expresi aktivního transkripčního faktoru HIF1, který stimuluje transkripci několika genů, účastnících se angiogeneze, jako VEGF (vascular endothelial growth factor) a VEGF-receptor. V normální tkáni dobře zásobené kyslíkem je hladina HIF1 udržována na nízké úrovni nepřetržitou ubiquitylací. Tento proces vyžaduje produkt dalšího genu, jenž je defektní ve vzácném von Hippel-Lindau syndromu. Výsledkem zvýšené produkce HIF1 a následně VEGF při tomto onemocnění dochází k tvorbě vysoce vaskularizovaných nádorů hemangioblastomů..

Zvýšená exprese VEGF v nádorech je spojena se zvýšenou angiogenezí, proliferací a metastatickou aktivitou. Bachelder *et al.*, 2002 dokázali, že VEGF je autokrinní faktor nezbytný pro přežití metastatických buněk rakoviny prsu MDA-MB-231 a je kritický pro jejich invazivitu. Inhibice VEGF anti-sense oligonukleotidem prokazatelně snižuje jejich schopnost invadovat Matrigel, tato schopnost je obnovena přidáním rekombinantního VEGF (Bachelder *et al.*, 2002).

Experiment Brugarolas *et al.*, 2003 dokládá funkci TSC2 v regulaci produkce VEGF přes mTOR závislou i nezávislou dráhu. Ztráta či inaktivace TSC2 v myších embryonálních fibroblastech v nepříznivých podmínkách (nízká koncentrace séra, prodloužená hypoxie) vedla k hromadění HIF-1 α a expresi odpovídajících proteinů. Jak bylo zmíněno výše, TSC2 inhibuje mTORC1. Při nedostatku růstových faktorů tato inhibice vede k hromadění nefosforylované S(6)K. V buňkách s inaktivovaným TSC2 deprivace séra nezabrání fosforylaci S(6)K a zároveň dochází k akumulaci HIF-1 α , což ukazuje na možnou regulaci tohoto faktoru přes mTOR. Také působení rapamycinu snižuje množství HIF-1 α , jehož akumulace v TSC2-null buňkách souvisí s neodpovídající aktivací (či přesněji absencí inhibice) mTORC1.

Stejný účinek rapamycinu potvrdil Heimberger *et al.*,2004 na gliomových buněčných liniích. Rapamycin snižuje produkci VEGF *in vitro* i *in vivo*, jak dokládá léčba subkutánního U-87 tumoru. (Heimberger *et al.*,2004)

mTOR tedy umožňuje dostupnost růstových faktorů, živin a kyslíku regulací exprese proteinů angiogenetické kaskády.



Obr.6 : Regulace HIF- α a inhibitory různých proteinů účastnících se angiogeneze (převzato z Klatte *et al.*,2007)

3.3 Aktinový cytoskelet

mTOR se v buňce vyskytuje ve odlišných multiproteinových komplexech, které se účastní rozdílných signálních drah a ovlivňují jiné buněčné funkce. mTORC1 se ukazuje být regulátorem exprese proteinů, avšak funkce teprve nedávno objeveného mTORC2 není zcela objasněna. Možným mechanismem, jakým mTOR přispívá k invazivitě nádorových buněk, může být regulace aktinového cytoskeletu., které se mohou účastnit oba komplexy, jak komplex 1 vlivem na expresi proteinů Rho/ROCK dráhy, tak i komplex 2 vlivem na aktivitu proteinů spojených s regulací tvaru buňky.

Vzhledem k tomu, že kvasinkový homolog savčího komplexu 2 reguluje polarizaci aktinového cytoskeletu, rozhodli se Jacinto *et al.*,2004 prověřit podobnou funkci u rictor-mTOR. Jaké faktory ovládají mTORC2, není zcela jasné. Růstové faktory, aminokyseliny a insulin přidané do media indukují polymeraci aktinu a tvorbu stresových vláken rapamycin nesensitivním způsobem, což ukazuje na kontrolu aktinového cytoskeletu mTOREM, konkrétně signalizací přes rictor-komplex.

Možné faktory, které tento komplex ovlivňuje, jsou malé RhoGTPázy. Aktivovaný Rac nebo Rho potlačují defekt polymerace aktinu vzniklý nepřítomností mTORC2. Dále byl pozorován 20-30% úbytek aktivního GTP-Rac1 v buňkách transfekovaných mTOR- nebo rictor-siRNA.

Knock-down mTORC2 zabraňuje také fosforylaci paxillinu a možnému sestavení fokálních adhezí.(Jacinto *et al.*,2004) Tyto výsledky tedy ukazují na možnou regulaci buněčného cytoskeletu a adheze, není však jasné, jaké efekторы mTORC2 ovládá. Nabízí se řešení, že tento komplex signalizuje skrze RhoGTPázy aktivací jednoho či více Rho-GEF.

Další popsáný mechanismus je fosforylace PKC α . Snížení exprese rictoru použitím siRNA vedlo ke snížení fosforylace této kinázy a také k omezení její kinázové aktivity. PKC α se účastní mnoha procesů jako potlačení apoptózy, kontrola buněčného cyklu a regulace tvaru a motility buňky. V pokusu s buňkami s knockdownovaným rictorem a PKC α buňky vykazují obdobnou stavbu aktinového cytoskeletu. Zdá se, že PKC α je hlavním zprostředkovatelem mTORC2 funkce (Sarbasov *et al.*,2004).

Jiné studie dokládají působení rapamycin-senzitivního komplexu na Rho/ROCK dráhu. V případě transplantace jaterního štěpu u krysího modelu rapamycin potlačoval expresi aktinu hladké svaloviny, množství mRNA a exprese Rho a ROCK1 byla snížena 48 h po transplantaci, stejným způsobem byla snížena i exprese VEGF. (Man *et al.*,2006)
U makrofágů signalizace skrze P-selectin glykoprotein ligand-1/Akt/mTOR reguluje syntézu ROCK1. Zvýšené nasedání ribozómů je rapamycin senzitivní, inhibice mTORu má za následek inhibice exprese ROCK1 (Fox *et al.*,2007).

Tyto práce dokládají vliv mTOR komplexu 1 i 2 na proteiny spojené s aktinovým cytoskeletem. Kontrola těchto proteinů přes mTOR se pravděpodobně odehrává na úrovni kontroly exprese a aktivace.

4.ZÁVĚR

Zmíněné studie naznačují možný vliv signalizace přes mTOR pro invazivitu nádorových buněk přes řadu dalších efektorů. PI3K/ Akt/ mTOR dráha kontroluje expresi metaloproteináz pravděpodobně na translační úrovni aktivační fosforylací mTORu. Tyto proteinázy umožňují pericelulární degradaci proteinů ECM a invazi nádorových buněk do okolí.

V rámci stresové odpovědi na osmotický stres a nedostatek živin a růstových faktorů mTOR zvyšuje expresi proteinů angiogenetické kaskády, což *in vivo* vede ke tvorbě nových kapilár a lepšímu zásobení tkáně. Procesu angiogeneze se nepřímo účastní také MMP.

mTOR se tedy zdá být součástí programu pro přežití v nepříznivých podmínkách, a to umožněním invaze a migrace do okolí i zajištěním potřebného zásobení růstovými faktory a živinami. Dalším aspektem invazivity je změna tvaru buňky a ztráta kontaktní inhibice, tj. nezávislost na buněčné adhezi. Na aktinový cytoskelet buňky má pravděpodobně vliv rapamycin nesensitivní komplex mTORu, jeho funkce a efekty však nejsou detailně objasněny. Polymeraci aktinu pravděpodobně reguluje přes Rho-GTPázy a PKC α . Zvýšená fosforylace této kinázy mTOREM má za následek remodelaci aktinového cytoskeletu.

Pro klinické využití je důležitá charakterizace funkce mTORu i poznání jeho efektorů. Na základě dosavadních poznatků lze hypotetizovat, že by se v budoucnu mohla uplatňovat cílená kombinovaná terapie zaměřená jak mTOR, tak i na konkrétní proteiny, které reguluje. Tento postup se osvědčil například u metastazujících nádorů ledvin, kde byly inhibovány jak mTOR, tak i VEGF a VEGFR. Tento způsob terapie je ve fázi raných klinických testů.

SEZNAM LITERATURE

Arthur, W.T., Noren, N.K., and Burridge, K. (2002). Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion, *Biological Research* 35, 239-246

Akagi, T., Murata, K., Shishido, T., and Hanafusa, H. (2002). *Molecular and Cell Biology* 22, 7015-7023

Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tschlis, P., and Vogt, P.K. (1998). The Akt kinase: Molecular determinants of oncogenicity, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14950-14955

Bachelder, R.E., Wendt, M.A., and Mercurio, A.M. (2002) Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4, *Cancer Res* 62, 7203-7206

Banyard, J., Anand-Apte, B., Symons, M., and Zetter, B.R. (2000). Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases, *Oncogene* (2000) 19, 580-591

Burgstaller, G., and Gimona, M. (2005) Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H3001-H3005

Brugarolas, J.B., Vazquez, F., Reddy, A., Sellers, W.R., and Kaelin, W.G. (2003). TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways, *Cancer Cell* 4, 147-158

Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., and Abraham, R.T. (1996). Direct inhibition of the signalling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002, *The EMBO Journal*, Vol 15, No 19, 5256-5267

Carragher, N.O., Walker, S.M., Scott Carragher, L.A., Harris, F., Sawyer, T.K., Brunton, V.G., Ozanne, B.W. and Frame, M.C. (2006). Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and ameboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function, *Oncogene* (2006) 25, 5726-5740

Carraway, H., and Hidalgo, M. (2004). Mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists, *Breast Canc Res* 6, 219-224

Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front, *Nature* 441, 444-450

- Duffy, M.J., Maguire, T.M., Hill, A., McDermott, E., and O'Higgins, N. (2000). Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis, *Breast Cancer Res* (2000) 2, 252-257
- Fox, R., Nhan, T.Q., Law, G.L., Morris, D.R., Liles, W.C., and Schwartz, S.M. (2007). PSGL-1 and mTOR regulate translation of ROCK-1 and physiological functions of macrophages, *EMBO* 26, 505-515
- Fry, M.J. (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big role might it play? *Breast Cancer Res* 3, 304-312
- Hannah, K.M., Branderburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., and Hannah, R.D. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcriptional factor UBF, *Molecular and Cell Biology* 23, 8862-8877
- Heimberger, A.B., Wang, E., McGary, E.C., Hess, K.R., Henry, V.K., Shono, T., Cohen, Z., Gumin, J., Sawaya, R., Conrad, C.A., and Lang, F.F. (2005). Mechanism of action of rapamycin in gliomas, *Neuro-Oncology* 7, 1-11
- Hiscox, S., and Jiang, W.G. (1999). Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/ β -catenin, *Journal of Cell Science* 112, 3081-3090
- Hresko, R.C., and Mueckler, M. (2005). mTOR/ rictor is Ser473 kinase for Akt/PKB in 3T3-L1 adipocytes, *Journal Biol.Chem.* 49, 40406-40416
- Ignatoski, K.M.W., Livant, D.L., Markwart, S., Grewal, N.K., and Ethier, S.P. (2003). The role of phosphatidylinositol 3'-kinase and its downstream signals in erbB-2-mediated transformation, *Molecular Cancer Research* 1, 551-560
- Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y., and Guan, K.L. (2005). Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69, 79-100
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive, *Nature Cell Biology* 11, 1122-1132
- Klatte, T., Pantuck, A.G., Kleid, M.D., and Beldegrunn, A.S. (2007). Understanding the natural biology of kidney cancer: Implications for targeted cancer therapy, *Reviews in Urology* 9, 47-56
- Linder, S., and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells, *Trends in Cell Biology* 13, 376-385

Man, K., Su, M., Ng, K.T., Lo, C.M., Zhao, Y., Ho, J.W., Sun, C.K., Lee, T.K., and Fan, S.T. (2006). Rapamycin attenuates liver graft injury in cirrhotic recipient- the significance of down-regulation of Rho-ROCK-VEGF pathway, *Am J Transplant* 6, 697-704

Manning, B.D., Tee, A.R., Longsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/ Akt pathway, *Molecular Cell* 10, 151-162

Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E.W., Sato, H., Seiki, M., Yunyun, Y., and Chen, W.T. (1996) Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7959-7964

Nakahara, H., Mueller, S.C., Nomizu, M., Yamada, Y., Yeh, Y., and Chen, W.T., (1997). Activation of $\beta 1$ integrin stimulates tyrosine fosforylation of p190^{RhoGAP} and membrane protrusive activities at invadopodia, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 273, No 1, 9-12

Park, B.K., Zeng, X., and Glazer, R.I. (2001). Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells, *Cancer Research* 61, 7647-7653

Raught, B., Gingras, A.C., and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins, *PNAS* 98, 7037-7044

Reiling, J.H., and Sabatini, D.M. (2006). Stress and mTOR signaling, *Oncogene* 25, 6373-6383

Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Cancer: loss of cell growth control, *Nature insights*

Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis, *Nature Cell Biology* 5, 711-719

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton, *Current Biology* 14, 1296-1302

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing role for the mTOR pathway, *Current opinion in cell biology* 17, 596-603

Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2000). TOR, a central controller of cell growth, *Cell* 103, 253-262

Suzuki, A., Lu, J., Kusakai, G., Kishimoto, A., Ogura, T., and Esumi, H. (2004). ARK5 is a tumour invasion-associated factor downstream of Akt signaling, *Molecular and Cell Biology* 8, 3526-3535

Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., and Blenis, J. (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signalling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb, *Current Biology* 13, 1259-1268

Will, H., Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B., and Murphy, G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autolytic activation, *J Biol Chem* 271, 17119-17123

Wyckoff, J.B., Pinner, S.E., Gschmeissner, S., Condeelis, J.S., and Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin- dependent matrix deformation enables protease independent-tumor cell invasion in vivo, *Current Biology* 16, 1515-1523

Zhang, D., Bar-Eli, M., Meloche, S., and Brodt, P. (2004). Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor, *J Biol Chem* 279, 19683-19690

Zhang, D., and Brodt, P. (2003). Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/ Akt signalling, *Oncogene* 22, 974-982

Zheng, Y., Rodrik, V., Toschi, A., Shi, M., Hui, L., Shen, Y., and Foster, D.A. (2006). Phospholipase D couples survival and migration signals in stress response of human cancer cells, *J.Biol.Chem.* 281, 15862-15868